

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE N° 99

Le
TÉTRACHLOROPHÉNOL

Etude de sa toxicologie
et de son pouvoir antiseptique

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 5 Juillet 1924

PAR

Pierre GUILLOT

Docteur en Pharmacie

Interne des Hôpitaux

Diplômé de Bactériologie de l'Université de Lyon

né à VIZILLE (Isère) le 5 Septembre 1901



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

Téléphone 63-56

1924

LE TÉTRACHLOROPHÉNOL

Etude de sa toxicologie et de son pouvoir antiseptique.

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE N° 99

Le
TÉTRACHLOROPHÉNOL

Etude de sa toxicologie
et de son pouvoir antiseptique

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 5 Juillet 1924

PAR

Pierre GUILLOT

Docteur en Pharmacie

Interne des Hôpitaux

Diplômé de Bactériologie de l'Université de Lyon

né à VIZILLE (Isère) le 5 Septembre 1901



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

Téléphone 63-56

1924

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire..... MM. H. HUGOUNENQ.
Doyen J. LEPINE.
Assesseur ROQUE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAMZENEUVE, BEAUVISAGE,
LACASSAGNE, TESTUT, FLORENCE (A.), TEISSIER.

PROFESSEURS

Cliniques médicales.....	MM. BAND.
Cliniques chirurgicales.....	ROQUE.
Clinique obstétricale et Accouchements.....	TIXIER.
Clinique ophtalmologique.....	BERARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	COMMANDEUR.
Clinique neurologique et psychiatrique.....	ROLLET.
Clinique des maladies des enfants.....	NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes.....	LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	WEILL.
Clinique des maladies des voies urinales.....	VILLARD.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie.....	LANNOIS.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	ROCHET.
Chimie biologique et médicale.....	NOVE-JOSSERAND
Chimie organique et Toxicologie.....	CLUZET.
Matière médicale et Botanique.....	HUGOUNENQ.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	MOREL.
Anatomie.....	BRETIN.
Histologie.....	GUIART.
Physiologie.....	LATARJET.
Pathologie interne.....	POLICARD.
Pathologie et Thérapeutiques générales.....	DOYON.
Anatomie pathologique.....	COLLET.
Chirurgie opératoire.....	MOURIQUAND.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie.....	PAVIOT.
Médecine légale.....	X.
Hygiène.....	ARLOING (F.).
Thérapeutique, hydrologie et climatologie.....	Etienne MARTIN.
Pharmacologie.....	COURMONT (P.).
	PIC.
	X.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe.....	MM. VALLAS.
— — Propédeutique de gynécologie.....	CONDAMIN.
— — Chimie minérale.....	BARRAL.
— — Urologie.....	GAYET.

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique.....	MM. PATEL.
Orthopédie.....	LAROYENNE.
Puériculture et hygiène de la première enfance.....	CHATIN.
Chirurgie expérimentale.....	LERICHE.
Stomatologie.....	TELLIER.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER.	COTTE.	CORDIER (V.).	MAZEL.
THEVENOT Léon.	DUROUX.	ROUBIER.	SANTY.
CARIN.	TRILLAT.	FÈVRE.	DUNET.
SAVY.	SARVONAT.	BONNET.	CHALIER (André).
FROMENT.	FLORENCE (G.).	RHENTER.	CHALIER (Joseph).
THEVENOT (Lucien)	ROCHAIX.	LEULIER.	NOEL.
PIÉRY.			CORDIER (Pierre).

M. BAYLE, secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. BARRAL, président ; PIÉRY, assesseur ;

FLORENCE et LEULIER, agrégés.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES GRANDS-PARENTS

A MON PERE ET A MA MERE

Faible témoignage de ma profonde
affection et de ma bien vive reconnaissance.

A MON FRERE ET A MA SŒUR

MEIS ET AMICIS

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE,
MONSIEUR LE PROFESSEUR BARRAL,
Chevalier de la Légion d'honneur

\ MONSIEUR LE PROFESSEUR DOYON,
Chevalier de la Légion d'honneur

AUX MEMBRES DE MON JURY

A MES MAITRES
A LA FACULTÉ ET DANS LES HÔPITAUX

En hommage respectueux.

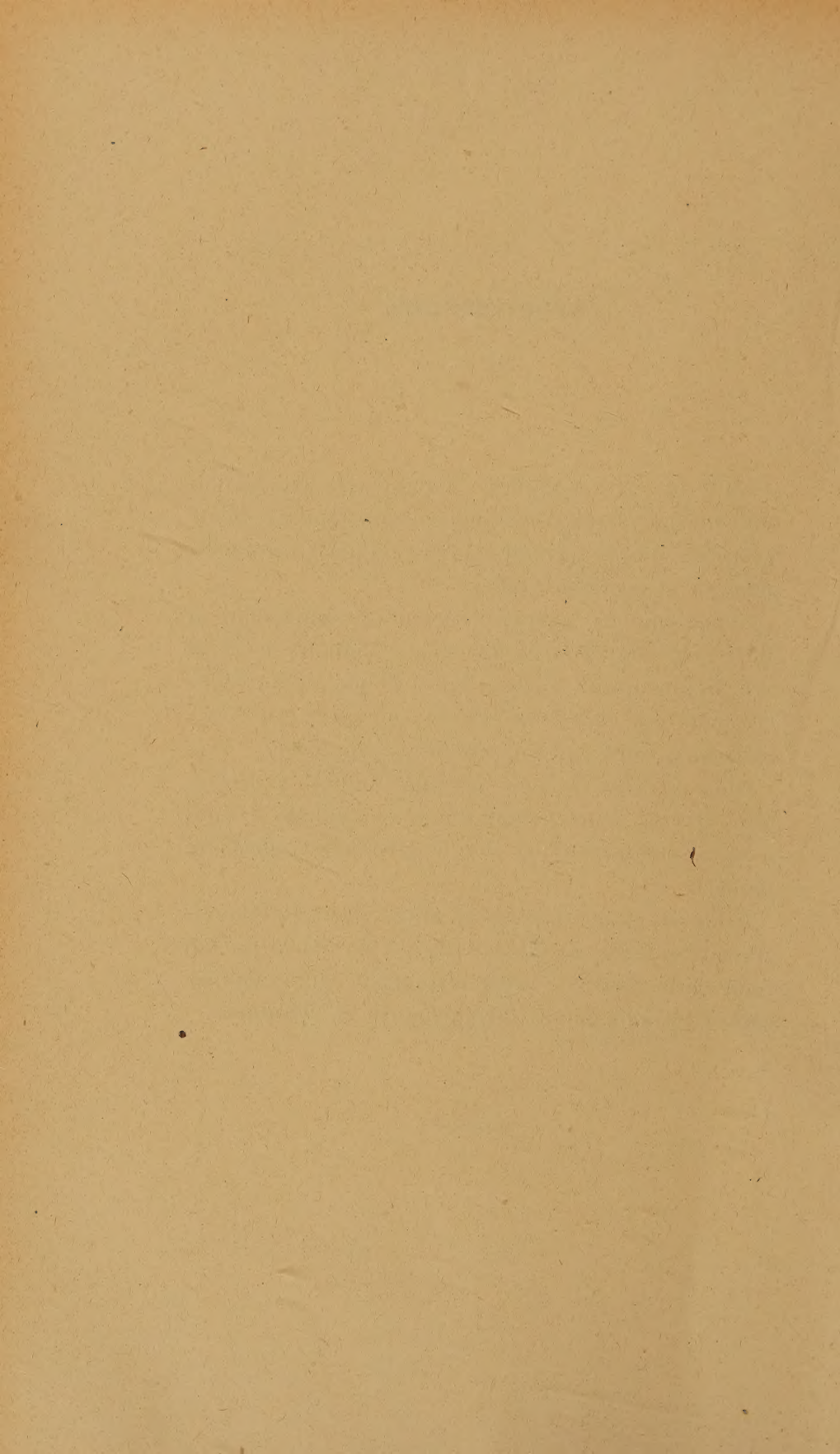
Avant-propos.

Au terme de nos études, c'est une vive satisfaction pour nous d'adresser nos plus sincères remerciements à tous les Maîtres qui ont contribué à notre formation générale et professionnelle.

Nous sommes particulièrement reconnaissant à M. le Professeur Barral, qui nous a toujours accueilli avec la plus grande bienveillance. Nous le remercions vivement des conseils qu'il nous a donnés et de l'honneur qu'il nous fait en présidant cette thèse.

Nous assurons de toute notre gratitude M. le Professeur Doyon, pour l'amabilité avec laquelle il nous a ouvert son laboratoire et aidé dans l'étude physiologique.

Nous remercions également Mlle Loison, M. Pauper-Ravaut, interne, et M. Batisse, préparateur, qui ont bien voulu mettre à notre disposition leurs connaissances physiologiques, histologiques et chimiques.



LE TETRACHLOROPHENOL

Etude de sa toxicologie et de son pouvoir antiseptique.

Introduction.

Les composés chlorés du phénol ont été l'objet, il y a une vingtaine d'années, de nombreuses recherches concernant leur préparation et leur constitution.

L'un d'entre eux, le tétrachlorophénol, particulièrement étudié par M. le Professeur Barral, a retenu notre attention; nous avons entrepris d'en expérimenter la toxicologie et le pouvoir antiseptique.

Nous avons cherché les travaux se rapportant à la toxicologie de produits analogues. Binet (4), en 1896, a fait paraître le résultat de nombreuses expériences sur les phénols et les monochlorophénols. Ses conclusions étaient les suivantes :

« Dans les phénols le remplacement d'un H par du Cl, Br, I, en rendant la molécule plus lourde, la rend moins toxique et d'autant moins que l'élément substitué pèse davantage... Les dérivés halogénés sont moins toxiques que les phénols, l'action antiseptique augmente au contraire. Le parachlorophénol est beaucoup plus antiseptique que le phénol. »

C'était également l'avis de Fränkel, cité par Henri-jean (10). Bechold et Erlich (3), en 1906, dans leur étude sur les phénols halogénés comme antiseptiques, indiquent la grande toxicité de ces corps. D'après eux, cette toxicité diminue, en effet, par rapport au phénol pour les mono et dichlorophénols, mais elle s'élève ensuite, au point que le trichlorophénol serait aussi toxique que le phénol, le tétra et le pentachlorophénol davantage. Cette courbe à minimum n'existerait pas pour l'action antiseptique dont la force serait d'autant plus grande qu'il y a davantage d'halogènes.

M. Baylé faisant dans le laboratoire de M. Barral un travail analogue au nôtre sur le pentachlorophénol, il nous a été possible de vérifier les deux opinions ci-dessus par rapport au phénol.

Dans une première partie, nous indiquons la préparation, les propriétés principales et les réactions pratiques du tétrachlorophénol.

La deuxième partie comprend l'établissement des doses toxiques et les symptômes concomitants pour différents animaux.

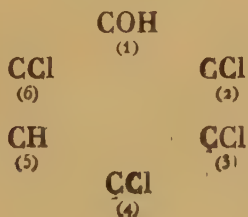
En troisième lieu, nous essayons d'établir l'action sur l'organisme et les modes d'élimination.

Enfin, dans une dernière partie, nous étudions le pouvoir antiseptique.

CHAPITRE PREMIER

Préparation et Propriétés du Tétrachlorophénol.

Le tétrachlorophénol de formule C^6HCl^4OH a été obtenu pour la première fois par M. Hugounenq (11), en 1890, en chauffant pendant 24 heures à 145° - 158° des tubes scellés contenant 6 grammes d'anisol tétrachloré avec 25 grammes d'acide iodhydrique. Il éprouva de grandes difficultés à le purifier; par analogie avec la constitution du tétrachloroanisole, M. Hugounenq donna au chlorophénol qu'il obtint la formule de constitution suivante :



En 1891 et 1894, MM. Zincke et Schaum (17), par d'autres procédés, spécialement réduction des cétones chlorés, obtinrent des produits sensiblement identiques. M. Barral (1), en 1895 et 1897, indiqua des procédés de chloruration du phénol permettant d'obtenir en assez grande quantité le tétrachlorophénol. Bien que la préparation en soit longue et la purification délicate, le tétrachlorophénol devenait ainsi relativement moins coûteux et d'un meilleur rendement.

M. Grosfillex (9), en 1901, s'inspirant des travaux de M. Barral, a étudié les procédés les plus fructueux conduisant au tétrachlorophénol. Le résultat de ses recherches fut le suivant :

Chloruration du phénol en présence de l'iode.

Le produit brut est fusible à 56° - 60° ; purifié, il garde une coloration rose et fond à $67^{\circ}5$ - 68° .

A l'analyse Cl pour 100, en moyenne: 61, 11; théorie pour $C^6 H Cl^4 OH$: 61,20.

Le rendement est de 85 pour 100.

Chloruration directe du phénol.

Le produit brut obtenu se purifie facilement et donne un produit blanc fondant à 67 - 68° .

Cl pour 100: 62. Rendement: 80 pour 100.

Chloruration en présence du chlorure d'antimoine.

Par cette méthode, à moins d'avoir un courant de chlore très sec, il y a toujours formation de chlora-nile. Le produit purifié, belles aiguilles blanches, fond à 66° - 67° .

Cl pour 100: 60,62. Rendement: 80 à 85 pour 100.

Chloruration en présence du perchlorure de fer anhydre.

C'est le procédé paraissant lui avoir donné les meilleurs résultats : chloruration rapide, diminution des matières goudroneuses, rendement 85 pour 100. Pur, fusible à 67°5-68°.

Cl pour 100: 60,62.

Nous ne suivrons pas M. Grosfillex dans les différents procédés de purification qu'il a indiqués, ne retenant que celui que nous avons employé.

Le tétrachlorophénol impur est d'abord traité par une petite quantité d'éther de pétrole à froid, qui s'empare des matières huileuses fortement colorées. Le produit restant, nous le dissolvons dans de la lessive de soude, puis nous ajoutons peu à peu de l'acide chlorhydrique en quantité suffisante pour précipiter un peu moins du dixième du produit, renfermant la presque totalité des impuretés. Après filtration, nous terminons la précipitation par l'acide chlorhydrique dilué, lavons à l'eau, et mettons à dessécher; le précipité rose pâle est traité par l'éther de pétrole à chaud, qui par évaporation, en séparant les toutes premières portions moins solubles et impures, nous donne de fines aiguilles blanches.

La purification déjà partielle du produit employé n'a pas nécessité la mise en œuvre du procédé de décoloration au bioxyde de sodium, indiqué par MM. Barral et Jambon pour le pentachlorophénol et appliqué par M. Grosfillex au tétrachlorophénol.

Propriétés.

Le tétrachlorophénol obtenu à l'état de pureté fond à 68°, ainsi que nous l'avons vérifié au bloc de Maquenne. Bien pulvérisé, il irrite la muqueuse nasale et provoque l'éternuement. Presque insoluble dans l'eau froide, un peu plus dans l'eau bouillante, il est par contre très soluble dans l'éther de pétrole, la benzine, l'alcool, la ligroïne, le chloroforme et le sulfure de carbone.

Nous empruntons à la thèse de M. Grosfillex un certain nombre de propriétés du tétrachlorophénol. Sous l'influence de la chaleur, il se colore peu à peu en rouge brun et dégage des fumées blanches irritantes et un peu d'acide chlorhydrique. « Soumis à l'action de la chaleur dans le vide, il se décompose en grande partie. L'acide sulfurique et même l'acide sulfurique Nordhausen, à une température supérieure à 100°, produisent une décomposition profonde, *sans toutefois qu'il y ait formation de dérivés sulfo-conjugués* (E. Barral). M. Hugounenq, en laissant en contact pendant plusieurs jours le mélange azoto-sulfurique sur du tétrachlorophénol, a obtenu un liquide rouge et des aiguilles jaunes de chloranile; il n'est pas arrivé à obtenir un dérivé nitré. »

Il se dissout très bien dans les alcalis dilués, même carbonatés, et nous n'avons pas constaté de précipitation de tétrachlorophénol sous l'action de l'acide carbonique de l'air. Le tétrachlorophénol dégage même à froid l'acide carbonique d'une solution de carbonate alcalin; ce déplacement s'accroît à chaud et la solution de tétrachlorophénate alcalin dans un excès d'alcali reste claire.

Les réactions que nous avons employées pour identifier le tétrachlorophénol sont de deux ordres :

a) *Action de certains agents oxydants conduisant à la formation de quinones chlorées à odeur et couleur caractéristiques.*

b) *Formation, par double décomposition, de sels colorés insolubles dans l'eau.*

Les réactions d'oxydation ont été basées sur les résultats des expériences de M. Barral en 1900 :

Formation de quinone trichlorée en même temps que des matières visqueuses contenant un peu d'acide chloranilique, en faisant agir pendant très peu de temps l'acide azotique fumant.

Formation des mêmes produits avec un peu de quinone tétrachlorée, en employant l'acide azotique ordinaire froid.

Formation des mêmes produits par décomposition de 25 % du tétrachlorophénol mis en œuvre, en faisant réagir le chlorate de potasse et l'acide chlorhydrique.

Avec ces données, nous avons essayé, afin d'obtenir des réactions rapides et d'une grande sensibilité : l'acide azotique, le mélange acide chlorhydrique et chlorate de potasse, le persulfate d'ammoniaque, le ferricyanure de potassium, l'hypochlorite de chaux.

ACIDE AZOTIQUE ORDINAIRE : ajouté dans une solution de tétrachlorophénate de soude, il produit d'abord un louche blanchâtre plus ou moins accentué, dû à la

formation de tétrachlorophénol; puis, en chauffant, ce trouble s'atténue et apparaît, dès 50°, une teinte jaune s'accroissant en orangé à plus haute température avec ménisque plus teinté et odeur forte et désagréable de quinone chlorée. Cette réaction est encore très nette à 1 pour 4.000 de tétrachlorophénol; à la dilution de 1 pour 5.000 elle est douteuse. A de fortes concentrations, il se produit des plaques rouges huileuses à la surface et au fond du tube. Il est nécessaire d'employer une quantité d'acide azotique égale environ au tiers du volume de la solution.

PERSULFATE D'AMMONIUM : lorsqu'on en ajoute une pincée dans une solution de sel de soude à 1 % de tétrachlorophénol, il se produit un précipité blanc à froid, jaunissant à chaud avec très forte odeur de quinones chlorées. A 1 pour 5.000, la réaction est encore nette et caractéristique par son odeur ; au-dessus de cette dilution elle est douteuse.

Les autres réactions d'oxydation sont bien moins sensibles et nous les avons rarement employées.

b) Nous basant sur la préparation et l'insolubilité de certains tétrachlorophénates obtenus par M. Grosfillex, nous avons effectué les réactions suivantes en ajoutant dans une solution de tétrachlorophénate de soude dans l'eau distillée :

Une solution saturée de SULFATE DE CUIVRE goutte à goutte : il se produit à froid un précipité rouge vineux de sel de cuivre.

Pour que cette réaction ait une grande sensibilité, il convient d'opérer en milieu rigoureusement neutre et avec de l'eau distillée; dans ces conditions, à la dilution de 1 p. 1000, le précipité se fonce presque immédiatement; à la dilution de 1 p. 50.000 il est encore très net, mais n'apparaît qu'au bout d'un certain temps, à 1 p. 100.000 la réaction est douteuse. Il est à noter que le tétrachlorophénate de cuivre est soluble à chaud.

Une solution de NITRATE D'ARGENT : il se forme un sel d'argent jaune, insoluble dans l'ammoniaque. Là également, il faut que le milieu soit rigoureusement neutre si l'on veut éviter la formation d'hydrate d'argent. A la dilution de 1 p. 100.000, on aperçoit encore très bien de petits flocons jaunes; à 1 p. 500.000 il se produit bien une légère coloration jaune, mais l'absence de précipité rend la réaction douteuse.

Une solution de NITRATE MERCURIQUE : un précipité blanc mais réaction bien moins sensible. Il en est de même pour le sel de manganèse.

Nous n'avons pas cru devoir nous arrêter au réactif de Millon qui donne un précipité jaunâtre à froid, brunissant à chaud, car cette réaction a été souvent infidèle et souvent positive lorsqu'il n'y avait pas de tétrachlorophénol.

Dans nos expériences, nous avons employé une solution du sel de sodium. Pour obtenir celui-ci, on prend une molécule de tétrachlorophénol que l'on

dissout dans de l'eau contenant un peu plus d'une molécule de soude en dissolution. On ajoute goutte à goutte de l'acide chlorhydrique étendu, en agitant continuellement jusqu'à formation d'un léger précipité; cette addition est nécessaire pour la destruction de l'alcali qui a été mis en excès au début. En opérant à 50-60°, cette neutralisation se fait plus rapidement. On obtient ainsi des solutions légèrement colorées en jaune pâle lorsqu'elles sont très concentrées, plus généralement incolores.

Afin de faciliter les calculs, nous avons toujours *évalué en tétrachlorophénol les quantités de solution de sel de soude employées*. Dans certains cas, nous avons eu à titrer certaines de ces solutions. Nous avons opéré de la sorte : à 10 cm³ de solution neutralisée à la phtaléine, nous ajoutons une quantité connue et en excès d'HCl N/10, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipitation. Après agitation, nous mesurons le volume de liquide et complétons à 50 cm³ avec de l'eau distillée ; nous filtrons et prélevons 25 cm³, dans lesquels nous dosons l'excès d'HCl par de la soude N/10 en présence de phtaléine. Soit n' le nombre de cm³ d'HCl et n le nombre de cm³ de NaOH, nous avons :

$$(n' - n) \times 2 \times 0,0232 = \text{quantité de C'HCl'OH contenue dans 1 cm}^3 \text{ de solution.}$$

CHAPITRE II

Doses toxiques.

Notre solution de tétrachlorophénate de soude ayant été rigoureusement neutralisée nous l'avons expérimentée sur divers organismes vivants. Nous parlerons d'abord des quelques essais effectués sur diverses graines, sur des insectes, sur des poissons ; puis nous montrerons comment nous avons établi la dose toxique successivement pour la grenouille, le cobaye et le chien.

Germination des graines.

Des graines sont placées sur des soucoupes avec du sable de Fontainebleau, bien lavé à l'acide chlorhydrique et à l'eau ; nous les arrosons avec des solutions plus ou moins diluées de tétrachlorophénate de soude, de telle sorte qu'elles soient humectées sans être trop mouillées. Nous plaçons les soucoupes à

l'étuve, à 28° environ, en y maintenant une humidité saturante par des tampons d'ouate gorgés d'eau.

Un premier essai est fait avec des graines de sarrazin, afin d'avoir une idée des doxes toxiques.

Témoin.	50 cg. ‰	100 cg. ‰	1000 cg. ‰
Premières pousses après 48 heures, se développent rapidement.	Pousses aussi rapides, aussi florissantes que celles du témoin.	Léger retard (12 h) mais pousse ensuite normalement.	Aucun germe ne paraît, même après 10 jours.

Nous faisons ensuite des essais comparatifs avec des graines de blé, sarrazin, navette et lentille ; nous obtenons les résultats suivants :

500 cg. ‰	250 cg. ‰
Aucun germe ne paraît, même après 15 jours.	Aucun germe ne paraît, même après 15 jours.

200 cg. ‰

Sarrazin : retard de 36 heures, les quelques pousses, après 48 heures, se dessèchent.

Navette : quelques germes tardifs.

Lentille, blé : aucun germe ne paraît.

150 cg. ‰	125 cg. ‰
<i>Sarrazin</i> : retard de 24 heures, mort trois jours après.	<i>Sarrazin</i> : léger retard, mais ensuite aussi vigoureux que le témoin.
<i>Autres graines</i> : aucun germe ne paraît.	<i>Autres graines</i> : aucun germe ne paraît.

La dose toxique était ainsi bien fixée pour le sarrazin, ainsi que les doses retardant la germination, mais pour les autres graines, nous avons dû continuer nos expériences avec des concentrations plus faibles.

‰	<i>Lentille.</i>	<i>Navette.</i>	<i>Blé.</i>
100 cg.	Rien.	Quelques pousses après 48 h., elles jaunissent et meurent.	Rien.
75 cg.	Rien.	Idem.	Rien.
50 cg.	Quelques germes tardifs qui périssent.	Retard de 24 h., puis pousses normales.	Rien.
25 cg.	Germes peu vigoureux, retardés.	Non différent du témoin.	Quelques pousses ne progressant pas.
10 cg.	Non différent du témoin.	Idem.	Pousses très tardives et lentes.

Il résulte donc de ces expériences que *le tétrachlorophénol retarde la germination des graines, qu'il l'empêche totalement à dose suffisante et que cette action est variable avec les graines étudiées.* La dose toxique peut donc être établie ainsi :

Par litre d'eau.

(albumen farineux) Graines de sarrazin . . . 2 gr.
 (albumen huileux) Graines de navette . . . 1 gr.
 (albumen farineux) Graines de lentille. . . . 0 gr. 25
 (albumen farineux) Graines de blé 0 gr. 10

si l'on ne tient pas compte, bien entendu, de quelques essais dans lesquels la navette a poussé à 2 gr. et le sarrazin n'a pas poussé à 1 gr. 50. Toutefois, vers les doses limites, les germes progressent difficilement et, ou bien meurent après quelques jours, ou bien périssent longtemps.

Insectes.

Passant ensuite au règne animal, nous signalons rapidement un essai sur des insectes.

Un sphynx, papillon crépusculaire, est placé sous un entonnoir avec des traces de tétrachlorophénol finement pulvérisé ; nous constatons d'abord une grande excitation, avec mouvements d'ailes violents dispersant le produit, puis une période de rémission d'environ une demi-heure. L'agitation frénétique recommence ensuite par moments et la mort survient une heure après le début de l'expérience.

Dans des conditions identiques, une grosse mouche (*Lucilia Coesar*) meurt après trois quarts d'heure : dans les derniers moments, elle ne peut plus voler et traîne difficilement les pattes de derrière. Des cloportes sont placées dans un nouet de gaze, maintenu suspendu par un bouchon dans un bocal renfermant environ 10 cg. pour 100 cm³ de tétrachlorophénol ; le résultat est négatif et les insectes vivent encore après 48 heures.

La non volatilisation du tétrachlorophénol rend donc son action insecticide illusoire, les insectes ne

succombant que lorsqu'ils dispersent le produit et en absorbent ainsi des particules avec leur trompe. L'emploi d'un solvant volatil, tel que l'éther de pétrole, ne modifierait pas le résultat et il faudrait tenir compte de l'action toxique de celui-ci.

Poissons.

Avec les essais sur les poissons, nous arrivons à des expériences plus intéressantes, car ce sont elles qui nous ont révélé, les premières, la haute toxicité de notre produit. Des perches du Canada, de 30 à 40 grammes, sont placées dans de larges bocaux contenant des proportions variables de sel de soude.

EXPÉRIENCE N° 1. — 4 *centigrammes par litre d'eau.*

Le poisson est pris d'une agitation intense, puis il tombe au fond du bocal rapidement ; il présente alors quelques tremblements et meurt en moins de huit minutes.

EXPÉRIENCE N° 2. — 1 *centigramme par litre*

Les réactions du poisson sont très vives au début, puis de la faiblesse se manifeste : il essaye en vain de nager jusqu'à la surface du liquide ; il retombe au fond. La mort survient au bout de 20 minutes.

EXPÉRIENCE N° 3. — 1 *milligramme par litre*

Les symptômes sont les mêmes, se précipitant moins cependant. Mort en une heure et quart.

Devant un effet toxique aussi élevé, nous nous sommes demandé si l'eau ordinaire ne dissocierait pas le tétrachlorophénate de soude en tétrachlorophénol et carbonate de soude, pour lequel les poissons sont très sensibles. Nous avons alors, dans une quatrième expérience, agité 2 centigrammes de tétrachlorophénol dans un litre d'eau : une perche de 40 grammes est morte dans ce milieu en moins de 5 minutes. Il n'y avait donc pas de doute à avoir.

Grenouilles.

Il ne nous était pas possible, avec des poissons, d'établir facilement la limite des doses toxiques ; nous avons débuté pour cela avec des grenouilles vertes. Par injection hypodermique dans les sacs lombaires et badigeonnage de collodion au point d'injection, pour empêcher tout retour du liquide, nous avons eu, en général, les symptômes suivants : la grenouille s'agite un certain temps, puis les réflexes des pattes de derrière s'affaiblissent peu à peu ; elle a quelques trémulations et la paralysie du train de derrière s'affirme : les pattes étendues ne peuvent être ramenées sous le ventre, mais sont traînées par le reste du corps. Bientôt, elle reste dans les positions où on la place, ne peut se redresser lorsqu'elle est mise sur le dos ; les quelques secousses musculaires s'espacent de plus en plus et la mort survient, précédée d'un coma plus ou moins long.

1° INJECTION HYPODERMIQUE

Nos	Poids	Dose		Résultats.
		injectée	p. 100 gr.	
	gr.	mmgr.	mmgr.	
1	40	1,00	2,50	Symptômes déjà décrits. Mort en 3/4 d'heure.
2	27	0,75	2,77	Paralysie presque immédiate. Mort en 20'.
3	45	0,50	1,11	Légère faiblesse 1 heure après. Guérison.
4	35	0,25	0,71	Affaiblissement progressif. Se remet. Guérison.
5	25	0,25	1,00	Réflexes diminués après 2 h. Mort en 3 h.
6	60	0,25	0,41	Guérison.
7	40	0,25	0,62	Guérison.
8	65	0,65	1,00	Inertie av. trémulations. Guérison.
9	60	0,72	1,20	Paralysie après une 1/2 h. Mort en 2 h.
10	60	0,52	0,88	Guérison.

Il semble donc que, toutes choses étant égales d'ailleurs, les grosses sont plus résistantes que les petites grenouilles, puisqu'une de 65 gr. a résisté à 1 milligr. pour 100 gr. de toxique, et une autre de 25 gr. a succombé. Nous avons eu, il est vrai, un cas de mort avec 1 milligr. 11. Nous fixerons donc, en conséquence, la dose toxique entre 1 milligr. et 1 milligr. 20 pour 100 gr., par voie hypodermique.

2° PAR VOIE GASTRIQUE

Les difficultés d'ingestion rendent les expériences moins précises ; cependant, l'emploi d'un compte-gouttes introduit profondément, permet d'éviter les causes d'erreur.

Nos	Poids	Dose absorbée	Dose p. 100 gr.	Résultats.
	gr.	mmgr.	mmgr.	
11	55	0,50	0,91	Guérison.
12	42	0,60	1,45	Inertie tardive avec trémulations. Guérison.
13	55	0,82	1,50	Etat nauséux, mais garde bien tout le liquide. Respiration très rapide 1 h. après ; le train de derrière a ses réflexes. 5 h. après, elle se tient sur le côté, haletante. Le lendemain elle est vivante, dans le même état. Mort 26 h. après. C'est le seul cas où nous ayons eu une mort aussi tardive. La dose toxique est donc aux environs de 1 mmgr. 50 par 100 gr.

3° Nous avons fait un essai par voie rectale

Poids : 30 gr. Dose : 0 milligr. 50. Dose pour 100 gr. : 1 milligr. 66. Légère paralysie du train de derrière débutant une heure après, puis faiblesse et trémulations augmentent, période d'inertie et de coma durant une heure. La mort survient après trois heures.

Enfin, sachant que les grenouilles absorbent facilement les liquides par la peau, nous en avons *immergé* une dans un petit cristalliseur contenant

2 milligr. de toxique pour 50 grammes d'eau. La tête émerge du liquide et le récipient est recouvert d'une plaque de verre percée d'un trou. Pendant une heure, la grenouille, très agitée, tourne sans cesse dans le cristalliseur ; puis elle se calme, les réflexes diminuent, surtout dans les pattes de derrière ; quelques contractures apparaissent et la mort survient dans l'insensibilité, au bout de deux heures.

Binet ayant signalé une *accoutumance* des animaux pour les monochlorophénols, nous avons essayé sur la grenouille avec le tétra et avons eu les résultats suivants :

Dates	Poids	Dose inject.	Dose p. 100 gr.	Résultats
	gr.	mmgr.	mmgr.	
4 Juillet	35	0,10	0,28	Rien à signaler.
7 Juillet	35	0,20	0,56	Idem.
10 Juillet	35	0,30	0,74	Idem.
14 Juillet	32	0,40	1,25	Idem.
19 Juillet	32	0,60	1,87	Excitation dès qu'on l'approche.
25 Juillet	30	0,80	2,66	Vive réaction au début, les réflexes commencent à être moins vifs 1 heure après. Mort en 2 heures avec quelques contractures. Cette grenouille a donc pu supporter une dose environ double de la dose toxique et totaliser en 20 jours 7 mmgr, 36 de produit pour 100 gr. d'animal, soit 7 fois la dose toxique. Il y a donc bien accoutumance ; peut-être cette grenouille aurait-elle résisté encore davantage si elle s'était alimentée.

Cobayes.

Plus démonstratifs furent les essais de toxicité sur le cobaye avec lequel nous avons pu constater des symptômes très nets. L'animal est d'abord inquiet et craintif après une injection toujours douloureuse ; la respiration, qui est de 40 à 50 en moyenne à la minute, devient plus rapide, en même temps qu'irrégulière ; nous notons plusieurs expirations rapides, suivies d'une pause, puis cinq ou six inspirations et expirations normales ; après une pause, le cycle recommence. L'animal devient apathique, se déplace difficilement, le train de derrière est rejeté sur le côté, *la respiration atteint 100 et 120 à la minute*, le pouls 320 et plus, le cobaye se met bientôt sur le flanc, pour ne plus se relever. La polypnée diminue cinq à dix minutes avant la mort ; les pattes de derrière ont alors perdu leurs réflexes ; encore quelques expirations brusques, suivies d'inspirations profondes, quelques contractions musculaires, l'animal perd son réflexe oculo-palpébral : il est mort. A part les premières minutes, pendant lesquelles le cobaye fait des efforts pour rendre ce qu'on lui a fait absorber, les symptômes sont identiques et la mort presque aussi rapide, lorsque l'intoxication a lieu par voie gastrique.

1° VOIE HYPODERMIQUE

Nos	Poids	Dose injectée	Dose p. 1 kg.	Résultats
	gr.	cgr.	cgr.	
1	600	2	3,33	Rien à signaler. Guérison
2	915	5	5,46	Rien à signaler. Guérison
3	515	6,43	12,50	Symptômes décrits. Mort en 3 heures.
4	650	6	9,23	Respiration irrégulière et polypnée, légère paralysie. Guérison.
5	470	7	14,9	Symptômes rapides. Mort en 1 h. 1/2.
6	675	8,1	12	Injection le matin, polypnée irrégulière et train de derrière rejeté sur le coté, tout l'après-midi, se rétablit dans la nuit. Guérison.
7	660	7	10,6	Respiration irrégulière et polypnée. Guérison.

2° VOIE GASTRIQUE

8	550	5,5	10	Polypnée après 6 heures, légère paralysie. Guérison.
9	520	8	15,3	Polypnée 1/2 h. après, symptômes rapides. Mort en 2 heures.
10	330	4	12,1	Premiers symptômes après 2 heures puis progressifs. Mort en 9 h.

Il est assez curieux de constater une *toxicité égale par voie hypodermique et par voie gastrique* ; nous la fixons à *12 centigrammes par kilo d'animal*, bien que nous ayons eu un cas de guérison avec une dose semblable par voie hypodermique. La mort survient toujours dans les 12 heures, sinon l'animal se rétablit.

Comme nous l'avions fait pour la grenouille, nous avons essayé s'il y avait ACCOUTUMANCE pour le cobaye. Les résultats ont été nettement positifs, mais il nous fut difficile de prolonger les expériences longtemps, par suite des inflammations locales aux points d'injection ou de l'amaigrissement des sujets, ce qui diminuait leur pouvoir de résistance au toxique.

Cobaye A (voie hypodermique)

Dates	Poids	Dose	Par kg.	Résultats
	gr.	cgr.	cgr.	
7 Nov.	675	8,4	12	Train de derrière rejeté sur le côté durant tout l'après-midi. Polypnée intense. Se rétablit lentement.
15 Nov.	625	7,5	12	Innapétance. Symptômes inexistantes.
22 Nov.	600	7,2	12	Rapidement dyspnée, puis se rétablit, mais apathie générale. Le 24 à midi ne pèse plus que 550 grammes. Mort le 25 au soir sans autres symptômes.
Quantités injectées en 15 jours		22,8	36 ‰	

Cobaye B (voie hypodermique)

Dates	Poids	Dose	Par kg.	Résultats
	gr.	cgr.	cgr.	
16 Nov.	310	2	6,45	Rien à signaler. Bon appétit.
19 Nov.	350	4	11,4	2 h. après, respirat. 120. Paralyse postérieure, réflexes diminués, boit av. avidité. Se rétablit.
23 Nov.	310	6	19,35	Moins malade que lors de la 2 ^{me} injection.
27 Nov.	300	8	26,6	Symptômes ordinaires. Mort en 6 h.
Totaux en 11 j.		20	63,80	Nous avons donc obtenu en ce cas une accumulation imposante avec des intervalles de temps très courts. L'animal a pu supporter une dose presque double de la dose toxique.

Cobaye C (voie gastrique)

A ce cobaye de 550 gr., nous faisons absorber tous les jours, à l'aide d'un compte-gouttes, 2 cg. de toxique, soit 4 cg. par kilo. Nous avons pu répéter cette opération pendant six jours consécutifs, après lesquels, le cobaye ne pesant plus que 460 gr., est mort en dix heures, après les symptômes habituels. Il a donc totalisé : 13 cg², soit 24 centigrammes par kilo.

L'accoutumance, quelle que soit la méthode employée, existe donc bien pour le cobaye à l'égard du tétrachlorophénol.

Chiens.

Notre premier essai sur le chien fut fait par *voie gastrique*. Une quantité connue de solution de tétrachlorophénate de soude, représentant 1 gr. 70 de tétrachlorophénol, a été évaporée à sec au B. M. La poudre obtenue fut incluse dans une capsule de gélatine, elle-même placée dans un morceau de viande que nous avons jeté au chien ; celui-ci avala cette boulette goulûment. L'animal pesant 8 kil. 500, la dose absorbée était donc de 0 gr. 20 par kilo, à 10 heures du matin, le 17 août.

L'animal était resté à jeun 15 heures ; au bout d'une heure, il présente de l'excitation et rompt la grille à laquelle il est attaché. Vers midi, il vomit. La respiration passe de 16 à 50 à la minute ; il boit avec avidité, essaye de manger, mais vomit de nouveau. A 16 heures, la respiration est aussi rapide, mais plus irrégulière. A 20 heures, il se couche ; il a encore des borborygmes fréquents. Le lendemain, il paraît dispos et mange avec appétit.

Le 20 août, soit trois jours après, les voies respiratoires sont encombrées ; il a des secousses cloniques du train de derrière et ses pattes sont très refroidies ; il descend avec peine les escaliers. Le soir, les contractures cessent, le chien redevient essoufflé et tourne

sans arrêt autour du poteau auquel il est attaché. Les jours suivants, rien à signaler ; le chien se rétablit.

Devant les difficultés pour obtenir un résultat précis par voie gastrique, étant donné les vomissements inévitables, nos autres expériences furent faites par *voie hypodermique*.

Chien n° 1. — Injection le 30 octobre 1923, à 15 heures. Poids : 15 kilos. Dose injectée : 1 gr. 50. Dose par kilo : 10 centigr. La respiration s'accroît légèrement deux heures après ; il mange bien le même soir et les jours suivants paraît normal.

Chien n° 2. — Injection le 8 novembre 1923, à 14 h. 30. Poids : 5 kil. 500. Dose injectée : 0 gr. 82. Dose par kilo : 15 centigr. L'injection de 8 cm² de liquide a été faite en trois points différents, afin de faciliter la résorption.

A 15 h.	{	Pouls	80	A 17 h.	{	Pouls	122
		Respiration. . .	15			Respiration. . .	22
		Température . .	39°			Température . .	38° 9

Le chien se tient tranquille, ne poussant que quelques grognements. A 18 heures, il mange la viande de sa soupe, mais laisse le pain ; il boit avec avidité. La respiration est de 50 à la minute, lorsqu'il est mis en cage, à 19 heures. Mort dans la nuit, après avoir vomi et présenté de la diarrhée.

Chien n° 3. — Injection le 28 novembre 1923, à 14 h. 30. Poids : 6 kilos. Dose injectée : 1 gr. 08. Dose par kilo : 18 centigr. La polypnée débute presque aussitôt et se maintient entre 30 et 40, durant tout l'après-midi et la journée du lendemain. Le chien boit beaucoup, mange peu ; le 30, il paraît tout à fait rétabli et pourtant la dose a été supérieure à celle injectée au chien n° 2. C'est qu'ici nous avons fait l'injection de 10 cm³ 8 de liquide en un seul point ; l'absorption a été très lente ; en effet, le 29 au matin, il y a encore du liquide non résorbé au point d'injection.

A ce même chien, le lendemain, à 10 heures, nous faisons, *en trois points différents*, une injection avec 90 centigr. de toxique, soit 15 centigr. par kilo. L'animal devient excité et cherche en vain un place pour se coucher ; il crie et se sauve plus loin. Au bout d'un quart d'heure cependant, il se blottit dans un coin et sa respiration s'accélère. Une heure après l'injection, il vomit par trois fois un liquide jaune d'or, puis il se recouche et la polypnée s'accroît jusqu'à 200 et 250 à la minute, avec un bruit de moteur. L'animal, qui ne peut plus se tenir debout, perd ses réflexes, puis sa respiration diminue, tout en restant stertoreuse ; il meurt à midi, soit deux heures après.

En somme, *la dose toxique pour le chien peut être fixée entre 10 et 15 centigr. par voie hypodermique*, les symptômes peuvent se prolonger assez longtemps. L'accoutumance paraît difficile à constater, ainsi qu'il résulte des essais sur le chien n° 3, et sur celui à qui

nous avons fait absorber 20 centigr. par voie gastrique, auquel, cinq jours après, nous avons injecté 16 centigr. par kilo, soit 1 gr. 28 pour 8 kilos, et qui est mort en six heures, après avoir présenté les symptômes déjà décrits.

Nous signalerons enfin les essais par *voie intraveineuse*, exécutés au laboratoire de M. le Professeur Doyon.

Chien n° IV { Poids . 20 kg.
Dose . 30 cgr.
Par kg. 15 mgr.

Chien n° V { Poids . 22 kg.
Dose . 26 cgr.
Par kg. 12 mgr.

Mort en 2 minutes.

La respiration après être passée par un maximum de 140 à la minute, tend à redevenir normale une heure après. Nous signalerons plus loin les autres effets physiologiques constatés.

Si, maintenant, nous nous reportons aux doses toxiques du phénol, d'après plusieurs auteurs, et des monochlorophénols d'après Binet, nous pouvons établir les concordances suivantes, qui fixeront les idées.

	Phénol	O. chloro	P. chloro	Tétrachloro- phénol
Grenouille verte pour 100 gr.	10 à 15 mgr.	15 à 20 mgr.		1 mgr. à 1 mgr. 20
Cobaye (p. 1 kg.)	50 cgr.	80cgr. à 1 gr.	1gr. 10 à 1gr. 30	12 à 15 cgr.
Chien (pour 1 kg.)	2 à 3 gr.	?	?	10 à 15 cgr.

Bechold et Erlich indiquent les doses toxiques suivantes pour 1 kilo de *souris blanche* :

Phénol	0 gr 25	Contractions
Trichlorophénol	0 gr. 24	Les contractions ne commencent qu'après quelques minutes.
Tétrachlorophénol	0 gr. 12	Légères crampes peu de temps avant la mort.
Tentachlorophénol	0 gr. 056	Pas de contractions

Si la toxicité des monochlorophénols est plus faible que celle du phénol, il n'en résulte pas pour cela, comme l'indique Binet, que cette toxicité aille en diminuant avec l'accumulation d'halogènes, et nos expériences montrent, cadrant avec celles de Bechold et Erlich, que cette toxicité est plus élevée pour le tétrachlorophénol.

CHAPITRE III

Le Tétrachlorophénol dans l'organisme.

Avant de rechercher l'action physiologique proprement dite du tétrachlorophénol sur l'organisme animal, nous allons montrer les modifications subies par les éléments de l'urine et comment nous y avons cherché l'élimination du toxique.

Les chiens, dont nous avons analysé méthodiquement les urines toutes les 24 heures, étaient soumis, durant les quatre ou cinq jours précédant l'injection, à un régime alimentaire ainsi fixé pour un chien de 10 kilos et par jour :

Viande desséchée	30 grammes
Chlorure de sodium	5 —
Graisse	10 —
Pain	200 —
Eau	ad libitum

Au bout du deuxième jour, la composition de l'urine se stabilisait et nous avons pris la moyenne des deux jours précédant l'injection pour établir la

composition normale de l'urine d'un chien. Celle-ci était recueillie grâce à un collecteur en zinc placé sous la cage et communiquant avec un récipient. Il nous fut rarement possible de déterminer le volume exact de l'émission *pro die* et, d'autre part, certains résultats peuvent être entachés d'erreur du fait de la présence de matières fécales ou d'aliments.

	Chiens n ^{os}	Avant	Après l'Injection			
			6 h.	12 h.	36 h.	48 h.
		gr.	gr.	gr.	gr.	gr.
Acidité apparente en HCl ‰	I	0,48	0,56		0,63	0,91
	III	0,45		2,40	0,98	
	II	0,65	0,87			
Acidité absolue en HCl ‰ (Méth. Maly-Denigès)	I	1,62	1,40		1,75	1,03
	III	1,81		5,03	1,82	
	II	?	?			
Acides aminés et Ammoniaque en NH ³ ‰ (Méthode Ronchèse)	I	0,44	0,54		0,32	0,25
	III	0,57		0,68	0,71	
	II	?	?			
Chlorures en NaCl ‰ (Méth. Charpentier-Vohlard)	I	4,37	2,35		1,30	
	III	5,88		1,10	0,85	
	II	3,51	0,53			
Phosphates en P ² O ⁵	I	0,70	0,66		1,05	1,50
	III	0,91		4,56	1,40	
	II	1,20	3,40			
Urée	I	11,08	14,10		17,60	20,80
	III	10,60		19,51	22,50	
	II	14,75	19,35			
Acide urique (Méthode Blarez)	I	1,12	0,82		2,70	2,65
	III	0,95			1,60	
	II	0,85	1,67			

De ces analyses, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

L'acidité augmente, surtout l'acidité apparente — nous ne tenons pas compte du chiffre peu vraisemblable d'acidité absolue du chien n° 2, 12 heures après — corrélativement aux phosphates.

L'ammoniaque ne varie pas d'une façon manifeste.

Les chlorures diminuent nettement, dans tous les cas ; il faut donc abandonner toute idée de réduction du chlorophénol dans l'organisme.

Les phosphates augmentent, eux aussi, dans tous les cas, comme dans toute urine pathologique.

L'urée et l'acide urique augmentent d'une façon très progressive, démontrant une suractivité de l'organisme luttant contre l'infection.

Nous avons dosé le soufre des *sulfo-éthers*, par le procédé de Salkowsky, en opérant sur 125 cm³ d'urine ; les résultats ont été identiques, avant et après l'injection, variant de 20 à 30 cg. par litre.

Considérons maintenant les éléments anormaux : la présence d'*albumine* est à peine manifestée pour le chien n° 1, 6 heures après (0 gr. 15 par litre) ; il n'y en a pas 36 heures après et en aucun moment pour les autres chiens.

Nous n'avons jamais eu de réduction bien apparente de la liqueur de Fehling ; cependant, pour le chien n° 2, en même temps qu'un changement de teinte

de ce réactif, nous avons eu un brunissement de la soude à chaud. Nous avons constaté la présence d'*acide glycuronique* pour le chien n° 1, par la réaction à la naphtho-résorcine, mais la difficulté de nous procurer cette substance ne nous a **pas permis** cette recherche pour les autres chiens ; nous avons bien essayé, pour le chien n° 2, la réaction de Goldschmidt (7) à l'anaphtol et qui fut légèrement positive, mais nous ne connaissons pas la valeur de cette réaction.

Les recherches de *bile* n'ont été qu'une ou deux fois positives et sans doute par contamination des fèces.

La diazo-réaction d'*Erlich* est toujours restée négative.

Enfin, nous n'avons jamais trouvé de *sang* dans les urines.

Nous avons essayé plusieurs procédés nous permettant de déceler **le tétrachlorophénol dans l'urine :**

La recherche directe, qui fut positive pour l'urine des chiens, peu après l'injection ou l'absorption, avec les réactions à l'acide nitrique et au persulfate d'ammoniaque.

Le traitement par l'acide sulfurique concentré froid, qui détruit la matière organique et ne touche pas au chlorophénol : nous n'avons pas eu de résultats par cette méthode.

L'épuisement de l'extrait sec, après acidification ou sans acidification, par l'éther de pétrole et reprise par une solution légèrement alcaline : les résultats ne

furent positifs que pour l'analyse du contenu stomacal du cobaye n° 9, mort en deux heures, après ingestion.

L'hydrolyse d'un supposé dérivé sulfo-conjugué, par ébullition une demi-heure en milieu faiblement chlorhydrique avec un long tube vertical faisant réfrigérant. Après distillation, nous n'avons pu obtenir les réactions du tétrachlorophénol ni sur le distillat, ni sur le résidu.

L'entraînement à la vapeur d'eau est le procédé que nous avons adopté, car il nous a donné les meilleurs résultats au point de vue constance et sensibilité. Le dispositif était le suivant : un ballon générateur de vapeur, avec un tube de sûreté, un petit tube régulateur par une pince de Mohr fixé sur un caoutchouc à l'extrémité de ce tube, enfin un troisième tube adducteur plongeant dans le deuxième ballon ; celui-ci contenait environ 50 cm³ d'urine et 10 cm³ d'acide sulfurique concentré ; l'appareil était complété par un réfrigérant descendant. Nous avons eu les réactions des chlorophénols très nettes dans le distillat, avec des urines contenant un milligramme de toxique pour 50 cm³.

Pour rendre le procédé plus sensible, nous avons opéré comme suit : après nous être rendus compte de l'acidité du distillat, nous le filtrons, puis traitons le filtre contenant les parcelles de C⁶HCl³OH par quelques centimètres cubes d'eau distillée et de la soude N/10, jusqu'à réaction rigoureusement neutre — c'est

le point délicat du procédé — ; nous filtrons et faisons sur le filtrat les réactions mentionnées dans notre premier chapitre : acide nitrique, persulfate d'ammoniaque, nitrate d'argent, sulfate de cuivre.

Nous avons ainsi retrouvé, six heures après l'injection, le toxique éliminé en nature dans l'urine du chien n° 2, où il était en abondance, dans l'urine du chien n° 3, douze heures après l'injection ; mais dans l'urine émise après 36 heures par ce même chien, nous n'avons eu que des réactions très faibles, dénotant la fin de l'élimination. Enfin, nous avons mis également à profit avec succès ce procédé pour les 5 cm³ environ d'urine prélevée par ponction à l'autopsie du cobaye C, soumis à une intoxication prolongée.

Le tétrachlorophénol s'élimine donc en nature, sans former de dérivé sulfo-conjugué ou glycuronique ; cette élimination, rapide, se termine environ 40 heures après l'injection. Mais, pendant ce séjour dans l'organisme, comment s'exerce sur celui-ci l'action du toxique ?

I. — GRENOUILLE

La paralysie et les légères trémulations sont d'origine centrale : en effet, après avoir effectué la *ligature lombaire de Cl. Bernard*, les nerfs sciatiques étant dégagés, 1 milligr. de toxique injecté dans la partie antérieure produit ces symptômes dans les membres postérieurs.

A l'autopsie, quelle que soit la voie d'intoxication, nous constatons toujours un foie très foncé, hyperhémisé ; les oreillettes battent encore quelque temps après la mort, le ventricule est brun noir.

Les recherches du toxique dans le foie, les reins, les extravasats sanguins, d'une part, les muscles, d'autre part, par les méthodes exposées ci-dessus après broyage avec du sable de Fontainebleau, ont été négatives.

II. — COBAYE

Devant la polypnée intense et pensant à l'asphyxie, nous avons essayé, pour le cobaye n° 5, intoxiqué avec 14 cg. 9 par kilo, l'action de l'oxygène, alors que sa respiration était de 120 à la minute. Pour cela, nous l'avons placé dans un vaste bocal fermé par un bouchon à deux tubulures ; par l'une arrivait de l'oxygène lavé et à débit réglé par une carafe d'eau ; l'autre tubulure communiquait avec l'atmosphère. La respiration devint, en effet, vite moins rapide ; l'animal sembla éprouver du bien-être, mais il mourut après deux ou trois violentes secousses, une demi-heure après.

A l'autopsie, les lésions n'ont rien de bien caractéristique ; elles sont les mêmes quelle que soit la voie d'intoxication, sauf peut-être un estomac plus tuméfié, lorsqu'il y a ingestion. Nous n'avons jamais constaté d'entérite. Le foie, les reins, les poumons et même l'encéphale sont généralement hyperhémisés. Le foie a souvent des zones décolorées ou grisâtres, tranchant

sur le fond très foncé ; les reins ont également fréquemment des marbrures et sont entourés de graisse. Il y a toujours des lésions dermiques très nettes aux points d'injection, avec zone inflammatoire bordée de rouge. Le sang, toujours très foncé, presque noir, est trouvé coagulé, en gros caillots, dans les oreillettes et l'arbre veineux, parfois non coagulé.

L'examen histologique du cobaye 10 a donné les résultats suivants : rien à signaler dans le rein, lésions hépatiques peu marquées : cellules volumineuses à protoplasme très acidophile, à noyau foncé et homogène ; la plupart sont isolées, quelques-unes sont groupées en amas. Peut-être une intoxication chronique aurait-elle donné des lésions plus marquées.

Nous avons recherché le toxique dans les viscères, d'après les procédés décrits plus haut pour l'urine et spécialement l'entraînement à la vapeur d'eau, après broyage avec du sable de Fontainebleau et addition d'un cinquième en volume d'acide sulfurique. Nous l'avons décelé facilement dans le foie du cobaye 10 et du cobaye A mort après accoutumance, à l'état de traces dans les poumons du cobaye C, mort après accoutumance par voie gastrique.

III. — CHIEN

Afin de déterminer exactement l'action du tétrachlorophénol sur la respiration et la circulation, nous avons demandé à M. le Professeur Doyon de prendre quelques tracés : aucun de ceux-ci ne montra une

action caractéristique, mais nous pûmes, par ces expériences, préciser certains points de l'intoxication.

Immédiatement après l'injection intra-veineuse, la pression baisse fortement, puis elle remonte lentement à peu près jusqu'au niveau antérieur, avec un léger renforcement de la systole. La respiration passe progressivement de 20 à la minute à 100 et 110 une demi-heure après ; à ce moment, nous constatons que le pneumogastrique reste excitable par un courant faradique qui produit un ralentissement très marqué des pulsations cardiaques et même de la respiration. Celle-ci tombe à 45 à la minute et se maintient ainsi encore 20 minutes, jusqu'à la mort (par section du bulbe). La température a passé de 38°8 avant l'injection à 39°7 trois quarts d'heure après ; si l'élévation n'est pas très forte, nous devons du moins signaler *qu'il n'y a pas hypothermie*, comme dans l'empoisonnement par le phénol. Pendant l'intoxication, la pupille s'est plutôt contractée que dilatée.

A l'autopsie, le sang très foncé est, en général, coagulé, du moins en partie ; nous avons, du reste, constaté expérimentalement ce fait avec du sang auquel nous avons ajouté quelques gouttes d'une solution de tétrachlorophénol. Nous n'avons pas vu, au spectroscope, d'autres raies que celle de l'oxyhémoglobine ; même *in vitro*, avec du sang humain, nous n'avons jamais eu le spectre de la méthémoglobine, soit en milieu acide, soit en milieu alcalin. Sur le chien n° 3, nous avons fait des dosages d'urée dans le sang prélevé avant chacune des deux injections et immédiatement après la mort ; nous avons eu les chiffres de

0 gr. 33, puis 0 gr. 60, enfin 1 gr. 10, ce qui montre l'activité des combustions du fait de l'intoxication.

Tous les organes sont fortement hyperhémisés ; le foie et les reins sont entourés d'une légère couche de graisse, des zones moins colorées sont visibles sur ces organes. Les lieux d'injection sont entourés de cercles hémorrhagiques vert-rougeâtres.

Le toxique a été retrouvé dans le foie et surtout dans les reins, en particulier pour le chien n° 2 ; nous l'avons décelé également dans un fragment d'intestin contenant quelques fèces.

Les urines des chiens étant toujours beaucoup plus foncées après intoxication, nous avons voulu y rechercher l'hydroquinone par solution dans l'éther avec l'extrait sec en milieu légèrement acide : nous n'en avons pas trouvé. Il semble donc qu'il n'y a aucune transformation du toxique à travers l'organisme, fortement éprouvé par lui, et que, s'il y a fixation dans certains organes, la plus grande partie s'élimine par les fèces et surtout par l'urine.

CHAPITRE IV

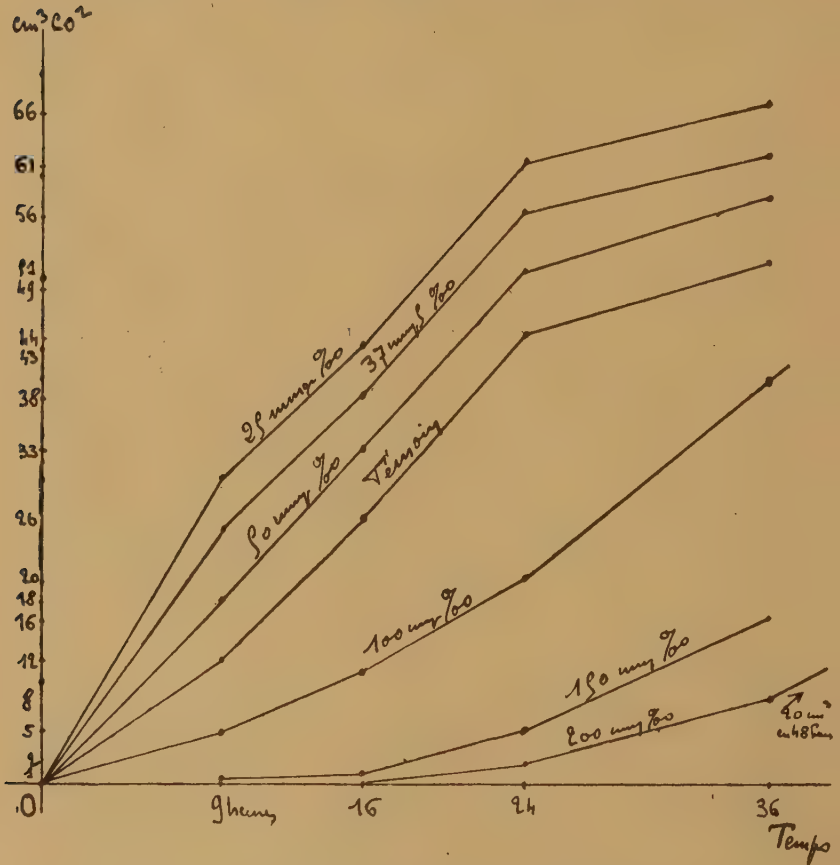
Doses stérilisantes.

Bien que l'étude de la valeur antiseptique d'un corps n'appartienne plus à la toxicologie proprement dite, elle nous renseigne cependant sur la manière dont il impressionne quelques-uns des êtres protoplasmiques placés au bas de l'échelle biologique et elle présente un intérêt pratique qui peut être considérable.

Nous avons essayé l'action du tétrachlorophénol sur la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, sur des eaux polluées par du colibacille et sur du sérum de cheval souillé par du staphylocoque doré. Nous avons dû faire des expériences assez nombreuses, en faisant varier parfois le mode opératoire, car les résultats ne concordaient pas toujours, étant donné la complexité des phénomènes biologiques. Nous ne mentionnerons donc que les essais ayant vraiment un caractère typique.

Levure de bière.

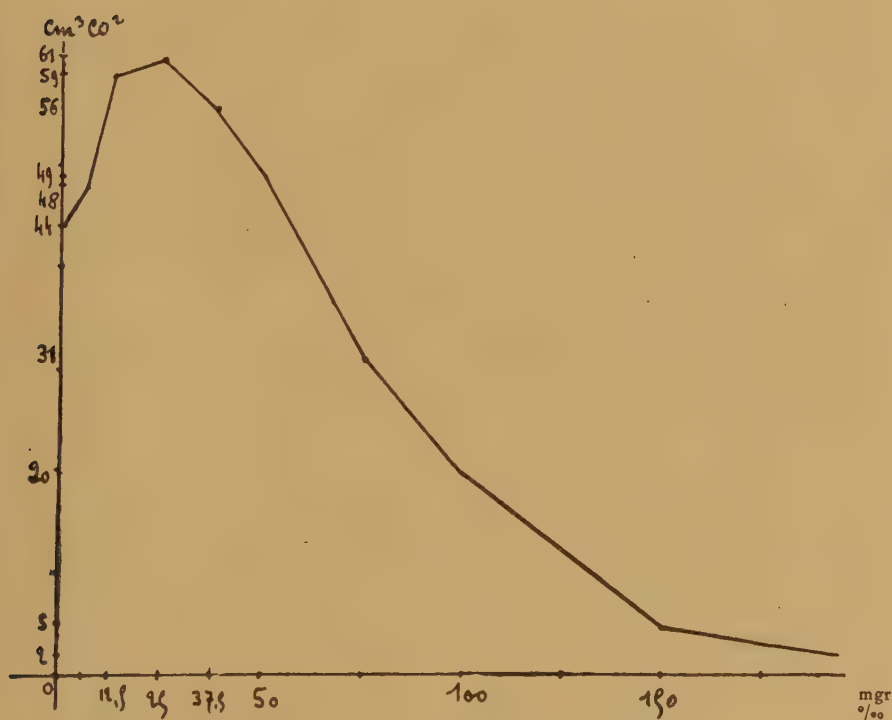
Nous nous sommes servis de tubes à essai de gros diamètre et de même capacité, fermés par un bou-



Fermentations de levure à 20°
après des temps et des concentrations variables.

chon traversé par un tube capillaire courbé en U ; après remplissage, les tubes étaient soigneusement paraffinés. Nous avons employé la même quantité de

levure pour chaque tube, en délayant celle-ci extemporanément dans une solution de glucose à 1 %, puis nous ajoutons la dose toxique sous forme de solution de sel de soude calculé en tétrachlorophénol par litre de liquide sucré.



Fermentations de levure après 24 heures à 20°

Les tubes retournés et ne présentant aucune bulle de gaz étaient placés soit à l'étuve à 40°, soit deux heures seulement à cette température, pour amorcer la fermentation, et ensuite à la température du laboratoire, soit simplement à cette dernière température

pendant 24 heures et plus. Pour mesurer l'acide carbonique dégagé, nous avons pesé les tubes avant et après chaque fermentation.

Les résultats, ainsi que le montrent les graphiques précédents, confirment la loi physiologique de Arndt : « Toute excitation légère a une action favorable sur la vitalité des éléments, une excitation moyenne la ralentit, une forte la suspend et tue. » En effet, à 37 milligr. de toxique par litre, la fermentation, supérieure à celle du témoin, passe par un maximum; à partir de 100 milligr. par litre, il y a retard à cette fermentation; enfin, à 350 milligr., la fermentation est arrêtée pratiquement, car c'est à peine si après une semaine on aperçoit une petite bulbe (1/2 cm³ environ) au sommet du tube, peut-être due à des pertes par le bouchon.

Si maintenant, nous considérons la dose de phénol donnée par Binet, comme arrêtant le développement de la levure, soit 6 grammes par litre, nous voyons qu'il suffit d'une quantité : $6 : 0,35 = 17$ fois plus faible.

Ferments lactiques.

Premier essai. — Du lait mis à l'autoclave à 120° pendant un quart d'heure, s'est coagulé. Le petit lait, neutralisé à la soude N/10, est réparti aseptiquement dans plusieurs tubes à essai avec de la teinture de tournesol et quelques gouttes d'une émulsion de ferments lactiques; la réaction est faiblement alcaline.

- 1^{er} tube : 5 milligr. par litre C⁶HCl⁴OH
 2^e tube : 10 milligr. par litre C⁶HCl⁴OH
 3^e tube : 30 milligr. par litre C⁶HCl⁴OH
 4^e tube : 40 milligr. par litre C⁶HCl⁴OH
 5^e tube : témoin.

Après 12 heures de séjour à 35-40°, nous constatons que seuls le témoin et les deux premiers tubes ont fait virer le tournesol ; les deux autres tubes n'ont une réaction acide manifeste que six heures après. La fermentation lactique a donc été retardée par la présence du tétrachlorophénol.

Deuxième essai. — Du bouillon Liebig est neutralisé après dilution convenable, puis lactosé à 2 % et additionné de ferments lactiques à raison d'un comprimé pour 100 gr. Nous répartissons ce milieu en flacons de 50 cm³, avec des doses croissantes d'antiseptique, et nous les plaçons à 35-40°. Nous ne constatons pas de variations sensibles d'acidité avant le huitième jour, où nous avons les résultats suivants pour 10 cm³ prélevés dans chaque flacon :

Doses de C ⁶ HCl ⁴ OH par litre		40 mgr.	50	100	150	200	500
Centimètres cubes de NaOH N/10 exigés	après 8 j	6,3	1,3	1	0,7	0,5	0
	après 15 j.	8,5	1,7	1,3	1,1	1	0

Ce milieu fut donc peu favorable au développement des ferments lactiques, à moins que ceux-ci aient été

d'une activité bien ralentie ; mais cet essai nous donne une idée de la dose empêchante d'antiseptique, 50 centigrammes par litre.

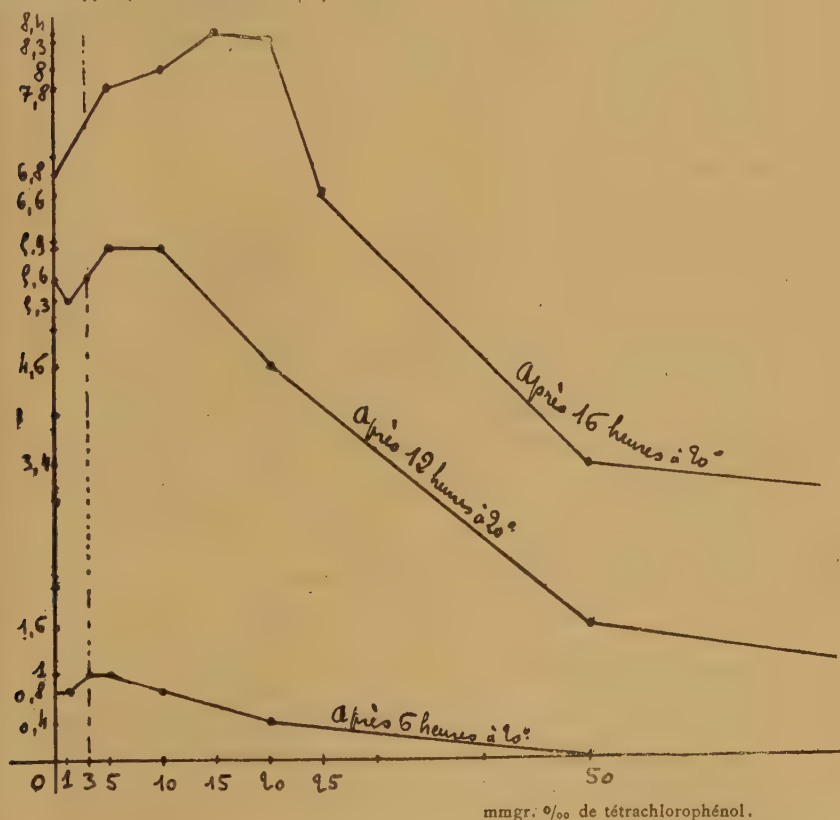
Troisième essai. — Du lait est réparti dans plusieurs tubes, à raison de 10 cm³ chacun, avec des doses de tétrachlorophénol variant de 25 à 300 milligr. par litre ; après un séjour de 24 heures à 40°, nous dosons l'acide lactique formé (tous les tubes sont coagulés) et trouvons pour tous une quantité sensiblement identique. de 7 grammes par litre. Le dosage a donc été fait trop tard et la fermentation s'est arrêtée à la limite de formation de l'acide lactique : les tubes retardés sont au même point que les autres.

Quatrième essai. — Il est semblable au précédent, mais avec 50 cm³ de lait bouilli pour chaque flacon ; des dosages d'acidité ont été faits toutes les six heures. Les flacons sont restés à la température du laboratoire. Les résultats sont condensés dans le graphique ci-après.

Comme pour la levure, nous constatons que de faibles doses d'antiseptique activent la fermentation ; des doses plus fortes la retardent ; mais il est difficile d'avoir une action d'arrêt ou dose infertilisante ; avec 50, 100 et même 800 milligr., l'acidité, nulle après six heures, se manifeste ensuite, et 24 heures après, elle atteint la limite de 6 gr. 50 à 7 grammes par litre.

D'après les travaux de Richet, Carnot et Roland (13), la dose nécessaire de phénol, pour obtenir, dans une fermentation lactique, une diminution de croît de 50 %, par rapport au croît des témoins, varie

Acidité développée (en Cm³ de NaOH N|10).



Fermentations lactiques.

toujours, quelques précautions qu'on prenne, d'une expérience à l'autre ; pour le phénol, la marge est de 0 gr. 44 à 1 gr. 38 par litre. Pour le tétrachlorophénol,

d'après les résultats mentionnés ci-dessus et ceux d'expériences identiques, nous avons la marge de 18 à 50 milligr. par litre, pour une diminution de croît de 50 %. Par rapport aux antiseptiques métalliques — à part le fluorure de sodium — le tétrachlorophénol peut donc être considéré comme un antiseptique à action relativement régulière, car les écarts sont beaucoup plus accusés pour ceux-là, d'après les mêmes auteurs.

Colibacille.

Une première série d'expériences est faite en introduisant directement deux gouttes d'une émulsion de colibacille, provenant d'une culture récente sur gélose, dans des tubes de bouillon contenant des doses variables de tétrachlorophénate de soude. Après ensemencement, les tubes sont placés à l'étuve à 37° ; nous avons les résultats suivants :

Témoin : pousse en 18 heures.

250 milligr. 0/00 : pousse après 48 heures.

300 et 400 milligr. 0/00 : pousse après trois jours.

500 milligr. 0/00 : pousse après 4 jours.

800 milligr., 1 gr. et 2 gr., ne poussent pas, même après huit jours.

Nous avons ensuite essayé avec une jeune culture de coli de 24 heures en bouillon, de laquelle nous mettions également deux gouttes pour 5 cm³ de liquide

(bouillon et antiseptique) dans chaque tube. Le colibacille, plus vivace, a été, dans ce cas, moins impressionné par le tétrachlorophénol.

Témoin : pousse en 12 heures.

250 milligr. : pousse en 24 heures.

500, 750, 1.000 milligr. : pousse après 48 heures.

1 gr. 25 : pousse après 48 heures.

1 gr. 50, 2 gr. : ne pousse pas.

Afin de pouvoir comparer le pouvoir antiseptique de notre produit avec celui du phénol, nous nous sommes inspirés de la méthode de Walker et Rideal (13), citée par Dakin (5). Une quantité déterminée, 5 gouttes, d'une culture de 24 heures en bouillon de colibacille est ajoutée à 5 cm³ de solutions progressivement diluées de l'antiseptique. Des subcultures sur bouillon sont faites aux intervalles de 5, 10, 15, 30 minutes pour déterminer le moment de la stérilité complète.

Doses ‰	5 '	10 '	15 '	30 '
1 gramme	+	+	+	—
1 gramme 25	+	+	—	—
1 gramme 50	+	—	—	—
1 gramme 75	+	—	—	—

Si nous comparons à la concentration minima de phénol donnant un résultat semblable dans les mêmes conditions et dans le même temps, soit 8 grammes par litre pour 15 minutes, nous avons, pour le tétrachlorophénol, le « phénol-coefficient » de 81,25, soit : 6,4.

Staphylocoque.

Nous avons d'abord expérimenté sur ce microbe dans les mêmes conditions que pour le colibacille, mais en ne faisant pour chaque dilution qu'une seule subculture en bouillon, 20 minutes après l'introduction du toxique. La grande sensibilité du staphylocoque, par rapport à celle du coli, a nécessité plusieurs séries d'expériences, avant d'arriver à des doses suffisamment faibles d'antiseptique. Les limites sont les suivantes :

50 milligr. par litre : + après 24 heures.

100 mliligr. par litre : + après 48 heures.

200 milligr. par litre : — même après 6 jours.

Bechold et Erlich (3) ayant signalé le peu d'activité des chlorophénols sur les microbes en présence de sérum sanguin ou d'autres substances albuminoïdes, alors qu'ils étaient très actifs sur les mêmes microbes en suspension dans l'eau, nous avons essayé l'action du tétrachlorophénol sur le staphylocoque en présence de sérum de cheval.

L'antiseptique et la culture de 24 heures (5 gouttes) sont mis dans 5 m³ de sérum de cheval dilué à 50 % d'eau distillée stérilisée — le pouvoir bactéricide du produit étant assez fort, la masse de celui-ci sera encore très faible relativement à celle du sérum. Après 20 minutes de contact, nous faisons des subcultures sur bouillon ; pour certaines dilutions nous avons fait

des subcultures une heure après : l'action léthale s'est montrée identique. Aucun antidote n'a été employé dans ces essais pour prévenir l'action inhibitrice de traces d'antiseptiques dans les cultures.

50 mgr. par litre : + après 24 heures.

100 » » : + » 48 »

250 » » : + » » »

500 » » : + » 3 jours. { + également pour

600 » » : + » 3 » { des prélèvements

750 » » : — même après 6 j. { ap. 1 h. de contact.

Nous résumons dans le tableau suivant l'action bactéricide comparée du tétrachlorophénol et du phénol expérimenté dans les mêmes conditions, sur le staphylocoque doré.

En suspension dans l'eau			dans du sérum		
Phénol	{ 1 : 250	—	1 : 50	—	
	{ 1 : 500	+	1 : 100	+	
Tétrachlorophénol	{ 1 : 5000	—	1 : 1333	—	
	{ 1 : 10.000	+	1 : 1666	+	

Nous voyons que notre produit a une action 20 fois plus forte que celle du phénol et que les proportions sont sensiblement gardées en milieu albumineux, soit 5 fois moins actif. Cette différence d'action ne provient pas d'une action coagulante, car le tétrachlorophénol ne coagule pas les albumines et il est assez stable pour résister à leur milieu réducteur.

Nous mentionnons en terminant l'action microbicide sur le *bacille de la diphtérie* publiée par Bechold et Erlich ; nous voyons que la forte antiseptie du tétrachlorophénol s'accuse encore davantage par rapport à celle du phénol.

	Effet absolu (moyenne)	Poids	Molécule
Phénol.....	1:800	1000	1000
Trichloro.....	1:10.000	80	40
Tétrachloro.....	1:20.000	40	16
Pentachloro.....	1:40.000	20	7

La comparaison est faite dans la deuxième colonne en prenant le phénol comme unité en poids ; dans la troisième, la comparaison, plus correcte d'après Bechold et Erlich, est faite d'après les molécules qui entrent en jeu. 16 molécules de tétrachlorophénol ont donc le même pouvoir bactéricide que 1000 molécules de phénol.

Conclusions.

I. — Le tétrachlorophénol est un corps plus toxique que le phénol, mais aussi plus antiseptique.

II. — Les animaux à sang-froid (poissons, grenouilles), y sont particulièrement sensibles et meurent rapidement.

III. — Le chien et le cobaye sont intoxiqués avec des doses variant de 12 à 15 centigrammes par kilogramme, après avoir présenté une respiration précipitée et irrégulière, et une paralysie plus ou moins marquée du train postérieur. Le pouls s'accélère et il n'y a pas hypothermie.

IV. — Les modifications subies par les urines ne sont pas très caractéristiques : tous les éléments augmentent, sauf les chlorures. Il n'y a pas de dérivés sulfo-conjugués, pas non plus d'albuminurie manifeste.

V. — Le toxique s'élimine en nature par les fecès et surtout par l'urine ; cette élimination est rapide.

VI. — Il n'y a pas de lésions caractéristiques à l'autopsie soit macroscopiquement, soit microscopiquement ; tous les organes sont hyperhémisés et fixent une

légère quantité de toxique, surtout les reins et le foie. Le sang, noir, se coagule rapidement ; nous n'y avons pas décelé de méthémoglobine.

VII. — La germination des graines est arrêtée par des doses variant de 0 gr. 10 à 2 gr. par litre. La fermentation alcoolique et la fermentation lactique, activée par de faibles doses, sont retardées par des doses moyennes et annihilées pour la levure, avec une dose de 0 gr. 35 par litre, soit environ 17 fois moins qu'avec le phénol.

VIII. — Le colibacille est tué en moins d'un quart d'heure par 1 gr. 25 de tétrachlorophénol pour un litre de bouillon, le staphylocoque doré par 0 gr. 20 et le bacille de Loeffler par 0 gr. 05.

IX. — L'action antiseptique est plus faible, 5 fois environ, en présence de matières albuminoïdes comme le sérum de cheval ; elle est encore cependant 20 fois plus forte environ que celle du phénol.

X. — La comparaison des équivalents thérapeutiques — rapport de l'équivalent toxique à l'équivalent antiseptique (Richaud) (14) — du tétrachlorophénol et du phénol donne pour le staphylocoque en milieu albumineux l'avantage au premier qui est 1,6 fois supérieur au phénol. Ce coefficient n'est pas suffisant pour faire du tétrachlorophénol un antiseptique supérieur au phénol.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
BARRAL

Vu :
LE DOYEN,
JEAN LÉPINE.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 10 Mai 1924

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
CAVALIER.

Bibliographie.

- 1 BARRAL. — Recherches sur quelques dérivés surchlorés du phénol, 1895.
- 2 BARRAL. — *Précis de Chimie biologique*.
- 3 BECHOLD et ERLICH. — Zeitch. F. Physiol. chem. XLVII, p. 173.
- 4 BINET. — *Revue médicale de la Suisse romande*, 1895 et 1896.
- 5 DAKIN et DAUFRESNE. — *Manuel des antiseptiques*, 1918.
- 6 FERRAND. — *Ann. d'Hyg. de Paris*, 1876, p. 498.
- 7 GOLDSCHMIEDT. — *Journal de Pharmacie et de Chirurgie*, 1910, II, p. 276.
- 8 GORUP-BESANEZ. — *Chimie physiologique*, p. 469, II.
- 9 GROSFILLEX. — *Recherches sur le tétrachlorophénol*. Thèse, Lyon, 1901.
- 10 HENRIJEAN. — *Pharmacodynamie*, première partie.
- 11 HUGOUNENQ. — *Thèse de la Faculté des Sciences*, Paris, 1890.
- 12 LEWIN et POUCHET. — *Traité de toxicologie*.

- 13 RICHET, CARNOT et ROLLAND. — *Bulletin de l'Académie des Sciences*, 1917, p. 669.
 - 14 RICHAUD. — *Précis de thérapeutique et de pharmacologie*, 1921.
 - 15 WALKER et RIDEAL. — *Journ. Roy. Soc. Industr.*, XXIV, 1903.
 - 16 WURTZ. — *Dictionnaire de Chimie et suppléments*.
 - 17 ZINCKE. — *Berichte ; d. d. Ch. Ges.*, 1894.
-

Table des Matières

Avant-Propos	7
Introduction	9
Chapitre I. — Préparation et propriétés du Tétrachlorophénol.	11
Chapitre II. — Doses toxiques	19
Chapitre III. — Le Tétrachlorophénol dans l'organisme	37
Chapitre IV. — Doses stérilisantes	47
Conclusions.	59
Bibliographie	61
